

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
11 DE 3820556 A1

21 Aktenzeichen: P 38 20 556.4  
22 Anmeldetag: 16. 6. 88  
43 Offenlegungstag: 21. 12. 89

51 Int. Cl. 4:  
G 01 N 33/53  
G 01 N 33/532  
C 07 K 15/06  
// C12N 15/00,5/00,  
C12P 19/34,  
C07H 21/04

Behördenelgenamt

DE 3820556 A1

71 Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

74 Vertreter:  
Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys.  
Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B.,  
Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel,  
J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000  
München

72 Erfinder:  
Albert, Winfried, Dr.phil., 8121 Pähl, DE; Grol,  
Michael, Dr.rer.nat., 8133 Feldafing, DE; Stahl, Peter,  
Dr.rer.nat., 8131 Bernried, DE

54 Verfahren zur Bestimmung von allergenspezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten

Zur Bestimmung von allergenspezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten nach dem Prinzip des Immunoassays durch Inkubation mit mindestens zwei Rezeptoren  $R_1$  und  $R_2$ , die mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähig sind, wobei  $R_2$  eine Markierung trägt, Trennung der festen von der flüssigen Phase und Messung der Markierung in einer der beiden Phasen, verwendet man als  $R_1$  das mit dem zu bestimmenden Antikörper spezifisch bindefähige Allergen und als  $R_2$  ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteten Antikörper und einer Markierung.

DE 3820556 A1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von allergenspezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten nach dem Prinzip des Immunoassays sowie ein hierzu geeignetes Reagenz.

Ein Anteil von etwa 15 bis 25% der Bevölkerung leidet an Allergien. Die häufigste Form der Allergie ist dabei die atopische Allergie, auch Allergie vom Soforttypus, anaphylaktischer Typ oder Typ I-Reaktion genannt. Bei dieser Form der Allergie treten die charakteristischen Symptome wie Heufieber, Asthmaanfall oder Urticaria unmittelbar nach Kontakt mit der die Allergie auslösenden und als Allergen bezeichneten Substanz auf. Typische Allergene sind Bestandteile des Kots der Hausstaubmilbe, Tierepithelien, Pollen, verschiedene Nahrungsmittel, Schimmelpilze und Insektengifte.

Über den Mechanismus der allergischen Reaktion ist bekannt, daß hier Immunglobuline der Klasse IgE wesentlich beteiligt sind. Die IgE-Antikörper binden mit hoher Affinität an Mastzellen und basophile Leukozyten. Wenn ein Allergen in Kontakt mit zellgebundenen IgE-Antikörpern kommt, werden physiologisch aktive zelluläre Mediatoren wie z.B. Histamin, Leukotriene, Prostaglandine u. a. freigesetzt. Dadurch läuft eine Reaktionskaskade ab, die die typischen Symptome verursacht. Hierzu zählen z. B. Kontraktion der Muskulatur der Atemwege, bis hin zu einem Asthmaanfall, Erweiterung der Blutgefäße und damit Rötung und Schwellung, Absonderung von Schleim, Juckreiz und Schmerz. Bei hochempfindlichen Personen kann es z. B. nach einem Insektenstich oder nach Injektion von Penicillin oder Procain zu einer anaphylaktischen Reaktion, die bis zum anaphylaktischen Schock oder sogar zum Tod führen kann, kommen. Nach neuesten Erkenntnissen sind auch spezifische und unspezifische Immunglobuline der Klasse IgG, insbesondere der Klasse IgG<sub>4</sub> an der allergischen Reaktion beteiligt.

Zur Diagnose von Allergien ermittelt man die im Blut vorhandenen spezifischen und unspezifischen IgE- und IgG-Antikörper. Zur Bestimmung von spezifischen oder unspezifischen Antikörpern werden sowohl in vivo Testmethoden, als auch in vitro Testmethoden angewendet. Als in vivo Testmethoden sind insbesondere Haut- und Provokationstests bekannt. Diese Tests können für Patienten stark belastend sein, insbesondere wenn die Gefahr eines anaphylaktischen Schocks besteht.

Aus diesen Gründen hat man versucht, die in vivo-Tests durch in vitro-Testmethoden zu ersetzen. Dabei werden zur Diagnose von Allergien einmal die Bestimmung der Gesamtkonzentration an IgE im Blut und zum anderen eine Bestimmung von allergenspezifischen IgE- bzw. IgG-Antikörpern durchgeführt. Die Bestimmung der Gesamt-IgE-Konzentration kann nur einen allgemeinen Hinweis auf das Bestehen einer allergischen Reaktion bieten und ist daher nur begrenzt aussagekräftig. Insbesondere erwünscht sind daher Methoden, mit denen allergenspezifisches IgE bzw. IgG nachgewiesen werden kann. Einerseits ist dies notwendig, um festzustellen, auf welche Allergene der Patient reagiert und damit eine wirkungsvolle Behandlung einleiten zu können und andererseits, um den Erfolg einer Hyposensibilisierung überwachen zu können.

Zum Nachweis von allergenspezifischen IgE-Antikörpern sind bereits einige in vitro-Bestimmungen bekannt. Diese Methoden basieren häufig auf dem Prinzip des Immunoassays, wobei jeweils das Allergen an die

festen Phase gebunden vorliegt. Das immobilisierte Allergen wird dann mit der Patientenprobe in Kontakt gebracht, wobei das allergenspezifische IgE an das immobilisierte Allergen bindet und unspezifisches IgE ausgewaschen wird. Anschließend wird der festphasengebundene Komplex aus Allergen und allergenspezifischem IgE mit markierten Anti-IgE-Antikörpern in Kontakt gebracht, die an das allergenspezifische IgE binden. Nach Auswaschung von überschüssigem markiertem Anti-IgE-Antikörper wird die Menge an gebundenem markiertem Anti-IgE-Antikörper bestimmt. Das Ergebnis ist ein direktes Maß für die Menge an allergenspezifischem IgE, das in der Probe vorhanden ist. Die Markierung erfolgt dabei üblicherweise durch ein Enzym oder eine radioaktive Substanz. Eine solche Variante ist beispielsweise in An. Clin. Biochem. 24 (1987), 232-245, beschrieben.

Der Nachteil dieser bekannten Nachweisverfahren liegt darin, daß das Allergen, das für die Durchführung der Verfahren notwendig ist, modifiziert wird z. B. indem es an einer Festphase immobilisiert vorliegt. Durch die Bindung z. B. an die Festphase tritt stets eine Veränderung des natürlichen Allergenepitopmusters auf, was auch zu einer Veränderung der Bindefähigkeit führt. Außerdem können nur allergenspezifische Antikörper nachgewiesen werden, für die immobilisierte Allergene angeboten werden. Es hat sich gezeigt, daß die Qualität handelsüblicher Allergenextrakte selbst innerhalb der gleichen Charge außerordentlich schwankt. Unterschiede der allergenen Potenz für bestimmte Allergenextrakte wie z. B. Hausstaub oder Schimmelpilze um den Faktor 1000 können auftreten.

Dies ist dadurch begründet, daß die Allergenextrakte meist eine komplexe Mischung von unterschiedlichen Einzelallergendeterminanten darstellen. Bis zu 80 v. r. verschiedene Epitope pro Allergen sind beschrieben worden.

Es wäre daher vorteilhaft, wenn man die Allergene, die auch für die in vivo Methoden eingesetzt werden, für einen in vitro Test verwenden könnte, ohne eine Abnahme der allergenen Potenz in Kauf nehmen zu müssen.

Es war daher Aufgabe der Erfindung, ein Nachweisverfahren zur Bestimmung von allergenspezifischen Antikörpern zur Verfügung zu stellen, bei denen die insbesondere zum Hauttest, zum Provokationstest oder zur Hyposensibilisierung verwendeten, nicht modifizierten z. B. immobilisierten Allergene ohne jede Modifizierung eingesetzt werden können. Darüber hinaus war es Aufgabe der Erfindung, ein Testverfahren zur Verfügung zu stellen, das einfach und schnell durchzuführen ist und in möglichst kurzer Zeit die gewünschten Ergebnisse liefert.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von allergenspezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten nach dem Prinzip des Immunoassays durch Inkubation mit mindestens zwei Rezeptoren R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>, die mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähig sind, wobei R<sub>2</sub> eine Markierung trägt, Trennung der festen von der flüssigen Phase und Messung der Markierung in einer der beiden Phasen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man als R<sub>1</sub> das mit dem zu bestimmenden Antikörper spezifisch bindefähige Allergen und als R<sub>2</sub> ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteten Antikörper und einer Markierung verwendet.

Überraschenderweise gelingt es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, bei Verwendung von nicht immobilisierten Allergenen, allergenspezifische Antikörper

genau und auch in sehr geringen Mengen nachzuweisen. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet die Möglichkeit, allergenspezifische Antikörper praktisch gegen alle Allergene, die im Handel sind, und insbesondere gegen Allergene, die für in vivo-Methoden verwendet werden, nachzuweisen.

Das Reaktionsprinzip einer bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Fig. 1 dargestellt. Dabei reagiert das als Rezeptor  $R_1$  bezeichnete Allergen mit den in der Probe vorhandenen allergenspezifischen Antikörpern. Abhängig von Anzahl und Art der Epitope auf dem Allergen reagieren jeweils mehrere, in der Probe vorhandene allergenspezifische Antikörper mit dem Allergen. Durch Zugabe von Rezeptor  $R_3$ , der entweder an eine Festphase gebunden ist (Fig. 1a) oder die Bindung an die Festphase vermittelt (Fig. 1b) und einen Antikörper, der gegen den Fc-Teil von IgE bzw. IgG gerichtet ist, enthält und von Rezeptor  $R_2$ , der ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE bzw. IgG gerichteten Antikörper und einer Markierung ist, wird das Allergen, an das die in der Probelösung befindlichen allergenspezifischen Antikörper gebunden sind, an einer Festphase immobilisiert, wobei die nicht an der Immobilisierung beteiligten, am Allergen gebundenen Antikörper das mit einer Markierung versehene Konjugat tragen. Nach Abtrennung der festen von der flüssigen Phase kann dann der Anteil an allergenspezifischen Antikörpern über den Anteil an gebundener Markierung bestimmt werden.

Für dieses erfindungsgemäß definierte Verfahrensprinzip gibt es mehrere Durchführungsvarianten.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Probe entweder gleichzeitig oder nacheinander mit mindestens zwei Rezeptoren inkubiert. Dabei ist der erste Rezeptor  $R_1$  das mit dem zu bestimmenden Antikörper spezifisch, bindefähige Allergen. Hier können alle Substanzen verwendet werden, deren allergene Wirkung bekannt ist. Insbesondere geeignet sind die in der in vivo-Diagnostik verwendeten Allergene. Wenn das Verfahren zur Überprüfung des Erfolgs einer Hypo-sensibilisierungsbehandlung verwendet wird, so werden bevorzugt die für die Hypo-sensibilisierung verwendeten Allergene ebenfalls im Testverfahren eingesetzt.

Das Allergen wird in flüssiger Phase eingesetzt.

Der zweite, für das erfindungsgemäße Verfahren erforderliche Rezeptor  $R_2$  ist ein Konjugat aus einem Anti-IgE- bzw. -IgG-Antikörper bzw. dessen Fragment und einer Markierung. Bevorzugt wird als Markierung ein Enzym, eine fluoreszierende, chemilumineszierende oder radioaktive Substanz verwendet. Verfahren zur Markierung von Antikörpern und Antikörperfragmenten sind dem Fachmann bekannt und bedürfen hier keiner weiteren Erläuterung. Die Bestimmung von gebundener Markierung und die Auswertung erfolgen ebenfalls nach dem Fachmann geläufigen Methoden.

In einer weiteren Ausführungsform kann der Rezeptor  $R_2$  auch aus einem Konjugat aus Anti-IgE- bzw. IgG-Antikörpern und einem partikulären Träger bestehen. Als partikuläre Träger geeignet sind z. B. Latexpartikel, Bentonit oder Erythrozyten. Durch Reaktion mit dem Komplex aus Allergen und allergenspezifischem Antikörper kommt es dann durch netzwerkartige Verbindung zu einer Agglutination, die turbidimetrisch nachgewiesen werden kann. Diese Form der Markierung wird insbesondere bevorzugt, wenn das Verfahren nur mit zwei Rezeptoren — dem Allergen und einem markierten Antikörper — durchgeführt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das er-

findungsgemäße Verfahren mit einem weiteren Rezeptor  $R_3$ , der die Bindung an die feste Phase vermittelt, durchgeführt. Der Rezeptor  $R_3$  besteht zum einen Teil aus einem gegen den Fc-Teil von IgE bzw. IgG gerichteten Antikörper. Dieser Antikörper ist so derivatisiert, daß er entweder an eine feste Phase gebunden vorliegt oder aber an eine feste Phase kuppelbar ist.

Als Antikörper wird hierzu bevorzugt ein Antikörper verwendet, dessen Paratop mit solchen Epitopen des Fc-Teils von IgE- bzw. IgG-Antikörpern bindet, daß eine Bindung eines weiteren Rezeptors  $R_2$  an den Fc-Teil unmöglich gemacht wird. Dadurch werden unspezifische Anlagerungen verhindert und die Genauigkeit des Testes noch weiter erhöht.

Der für den Rezeptor  $R_3$  verwendete Antikörper kann ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper sein. Unter Antikörper werden in diesem Zusammenhang auch Antikörperfragmente verstanden.

Der Rezeptor  $R_3$  vermittelt die Bindung des Komplexes aus Allergen und zu bestimmenden Antikörpern an eine feste Phase. Dazu kann in einer Ausführungsform der Rezeptor  $R_3$  an eine feste Phase gebunden sein. Die Bindung erfolgt dabei nach den üblichen, dem Fachmann bekannten Methoden. Sowohl eine kovalente als auch eine adsorptive Bindung ist geeignet. Bevorzugt wird jedoch wegen der hierbei erzielbaren höheren Ausbeute und der vereinfachten Arbeitsweise eine lediglich adsorptive Bindung, beispielsweise an Kunststoff. Als feste Phase, besonders geeignet sind Reagenzglaschen oder Mikrotiterplatten aus Polystyrol und ähnlichen Kunststoffen, die adsorptiv an der Innenoberfläche mit  $R_3$  beschichtet sind. Weiterhin geeignet sind auch teilchenförmige Substanzen, z. B. Molekularsiebmateriale, Glasperlen, Kunststoffschläuche und dergleichen. Ebenfalls geeignet sind als feste Phase auch poröse schichtförmige Träger wie Papier.

In einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht der Rezeptor  $R_3$  aus einem Konjugat des Anti-IgE- bzw. -IgG-Antikörpers mit einem Bindungspartner eines spezifisch bindenden Paares. Dieser Bindungspartner eines spezifisch bindenden Paares vermittelt dann die Bindung an die feste Phase. Dazu kann der andere Bindungspartner an der festen Phase gebunden sein, so daß die Immobilisierung durch Bindung der beiden Partner miteinander erfolgt. Besonders bevorzugt wird dazu eine Festphase, an der Streptavidin gebunden ist und ein biotinylierter Rezeptor  $R_3$  verwendet, so daß Biotin als Partner des spezifisch bindenden Paares Biotin/Streptavidin die Bindung an die mit Streptavidin beschichtete Festphase vermittelt.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die feste Phase ebenfalls mit einem Bindungspartner eines spezifisch bindenden Paares beschichtet. Die Bestimmungsreaktion wird dann in homogener Phase durchgeführt und nach Abschluß der Reaktion wird dann eine zweite spezifisch bindefähige Substanz zugegeben, die sowohl Bindungsstellen für den an den Antikörper gebundenen Bindungspartner aufweist als auch Bindungsstellen für den an die feste Phase gebundenen Bindungspartner. Diese Substanz bewirkt dann die Immobilisierung des Konjugates. Als Bindungspartner, mit denen der Rezeptor  $R_3$  konjugiert werden kann, sind z. B. Biotin, Avidin, Haptene, Antigene sowie Protein A u. a. geeignet. Die zur Immobilisierung an der festen Phase gebundene bzw. zugegebene Substanz enthält dann den jeweils spezifisch mit diesem Bindungspartner bindenden anderen Partner, also insbesondere Avidin, Streptavidin, Biotin und Immunglobulin. Ebenso sind

derartige Bindungspaare geeignet für die Bindung zwischen der festen Phase und der die Bindung vermittelnden zweiten Substanz.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens gibt es verschiedene Varianten. Das Verfahren kann einstufig oder mehrstufig durchgeführt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist für die verschiedensten Durchführungsarten, die dem Fachmann bekannt sind, geeignet.

So kann in einer bevorzugten Ausführungsform zuerst eine den zu bestimmenden Antikörper enthaltende Probe mit dem als Rezeptor  $R_1$  bezeichneten spezifischen Allergen inkubiert werden. Im zweiten Schritt wird dann Rezeptor  $R_3$  sowie Rezeptor  $R_2$  zugegeben und nochmals inkubiert. Nach der üblichen Behandlung des Reaktionssystems wird dann nach Abtrennung der gebundenen von der ungebundenen Markierung die Markierung in einer der Phasen in bekannter Weise bestimmt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird zuerst eine den zu bestimmenden Antikörper enthaltende Probe mit dem an die feste Phase gebundenen Rezeptor  $R_3$  inkubiert. Dabei werden die in der Probelösung vorhandenen Antikörper der IgE- bzw. IgG-Klasse über ihren Fc-Teil an  $R_3$  gebunden. Nach dem Auswaschen wird anschließend die Lösung mit dem Allergen, das mit den zu bestimmenden allergenspezifischen Antikörpern bindet, inkubiert. Dabei binden nur die allergenspezifischen, an  $R_3$  gebundenen IgE- bzw. IgG-Antikörper diese Allergenmoleküle. Nach erneutem Auswaschen wird nochmals eine die zu bestimmenden Antikörper enthaltende Probelösung zugegeben und inkubiert. Da bevorzugt alle an der festen Phase vorhandenen Bindungsstellen für IgE- bzw. IgG-Antikörper durch die erste Inkubation abgesättigt sind, binden die entsprechenden, in der Probelösung vorhandenen allergenspezifischen Antikörper an die immobilisierten Allergenmoleküle. Gleichzeitig oder nach erneutem Auswaschen wird dann der Reaktionslösung, die den Komplex aus  $R_3$ , zu bestimmendem allergenspezifischen Antikörper und Allergen enthält, eine Lösung von  $R_2$  zugegeben.  $R_2$  wird über den Antikörperanteil an den Fc-Teil der am Allergen gebundenen, zu bestimmenden Antikörper gebunden. Um eine genaue Bestimmung ohne Verfälschungen durch unspezifische Anlagerungen durchführen zu können, muß ausgeschlossen werden, daß  $R_2$  an andere als die zu bestimmenden allergenspezifischen Antikörper bindet. Um dies sicherzustellen, wird in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung für  $R_3$  ein Anti-IgE- bzw. -IgG-Antikörper verwendet, dessen Paratop mit solchen Epitopen des Fc-Teils von IgE- bzw. IgG-Antikörpern binden, daß eine Bindung eines weiteren Rezeptors  $R_2$  an den Fc-Teil unmöglich gemacht wird.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die unspezifische Bindung dadurch verhindert, daß man nach Inkubation von  $R_3$  mit der Probe, wobei die zu bestimmenden Antikörper an  $R_3$  gebunden werden, Fc-Fragmente von IgE- bzw. IgG-Antikörpern im Überschuß zugeibt, so daß alle noch vorhandenen Bindungsstellen der an  $R_3$  gebundenen, zu bestimmenden Antikörper abgedeckt werden.

Nach Trennung der festen von der flüssigen Phase wird die Menge an gebundener Markierung in an sich bekannter Weise bestimmt. Gleichzeitig mit dem Bestimmungsverfahren wird eine zweite Bestimmung durchgeführt, bei der statt der Probe eine Vergleichslösung eingesetzt wird, die sicher keine für das fragliche

Allergen spezifischen Antikörper enthält. Geeignet sind dazu z. B. Seren von Nichtallergikern. Durch Vergleich der für die beiden Proben erhaltenen Werte kann dann die Konzentration des allergenspezifischen Antikörpers in der Probe bestimmt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren einstufig durchgeführt. Dabei werden bevorzugt in einem Reaktionsgefäß, das an eine Festphase gebunden einen Partner eines spezifisch bindenden Paares enthält, die Probe zusammen mit den Rezeptoren  $R_2$  und  $R_3$  inkubiert. Dabei binden die in der Probe vorhandenen allergenspezifischen Antikörper an das zugegebene Allergen. Weiterhin binden die Rezeptoren  $R_2$  und  $R_3$  jeweils an den Fc-Teil des zu bestimmenden allergenspezifischen Antikörpers. Die Konzentration der beiden Rezeptoren  $R_2$  und  $R_3$  wird so gewählt, daß gewährleistet ist, daß an jedem Allergenkomplex genügend  $R_3$  und  $R_2$  gebunden wird, um einerseits die Festphasenbindung zu sichern und andererseits ausreichend spezifisch gebundenen  $R_2$  für die Nachweisreaktion zur Verfügung zu haben. Dies bedeutet, daß  $R_2$  weder in einem großen Überschuß, noch in einem großen Unterschuß gegenüber  $R_3$  vorhanden sein darf. Das optimale Verhältnis von  $R_2$  zu  $R_3$  kann experimentell über die Optimierung des Meßsignals ermittelt werden. Das Verhältnis von  $R_2$  zu  $R_3$  liegt vorzugsweise im Bereich von 1:1.

Besonders bevorzugt wird für diese Verfahrensvariante als Rezeptor  $R_3$  ein Konjugat aus dem Anti-IgE- bzw. Anti-IgG-Antikörper und einem Bindungspartner eines spezifisch bindenden Paares verwendet. Die Reaktion zwischen Allergen, zu bestimmendem Antikörper und den Rezeptoren  $R_2$  und  $R_3$  verläuft dann praktisch in homogener Phase. Entweder liegt der andere Bindungspartner an die Festphase gebunden vor, so daß die Reaktion mit dem an der Festphase gebundenen Bindungspartner sehr viel langsamer stattfindet oder nach beendeter Reaktion wird eine Substanz zugegeben, die sowohl mit dem an der Festphase gebundenen Bindungspartner als auch mit dem Bindungspartner des Rezeptors  $R_3$  bindenfähig ist, um die gebildeten Allergen-Antikörper-Komplexe zu immobilisieren. Die Auswertung erfolgt dann in an sich bekannter Weise über die gebundene Markierung.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können allergenspezifische Antikörper in Körperflüssigkeiten genau und spezifisch nachgewiesen werden. Das erfindungsgemäße Verfahren liefert darüber hinaus die Möglichkeit, die zur Hyposensibilisierung oder zum Provokationstest verwendeten Allergene patientenspezifisch zu testen und zu standardisieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur Bestimmung von allergenspezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es einen Rezeptor  $R_1$ , der ein mit dem zu bestimmenden Antikörper spezifisches Allergen ist und einen Rezeptor  $R_2$ , der ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteten Antikörper und einer Markierung ist, physikalisch voneinander getrennt enthält.

Mit diesem Reagenz kann das Verfahren zur Bestimmung eines allergenspezifischen Antikörpers für jedes Allergen, das dem Arzt zur Verfügung steht, durchgeführt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Reagenz noch einen weiteren Rezeptor  $R_3$ , der einen gegen den Fc-Teil in IgE oder IgG gerichteten Antikörper enthält und die Bindung an die feste Phase vermit-

telt.

Die Erfindung wird durch die Figur und die folgenden Beispiele erläutert.

Fig. 1a zeigt ein Schema für das Reaktionsprinzip einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Nach Umsetzung einer Probelösung mit 3 Rezeptoren  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$ , von denen  $R_1$  das mit dem zu bestimmenden allergenspezifischen Antikörper spezifische Allergen ist,  $R_2$  ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE bzw. IgG gerichteten Antikörper und einer Markierung und  $R_3$  ein die Bindung an die Festphase vermittelnder Rezeptor, der einen gegen den Fc-Teil von IgE bzw. IgG gerichteten Antikörper enthält, ist, bildet sich der dargestellte Komplex. An das Allergen 1 sind die in der Probelösung enthaltenen, zu bestimmenden allergenspezifischen Antikörper 3 gebunden. Die Immobilisierung erfolgt über an den Fc-Teil eines allergenspezifischen Antikörpers gebundene Rezeptoren 5, die an eine Festphase 7 gebunden sind. An die übrigen allergenspezifischen Antikörper 3 sind markierte Rezeptoren 9 gebunden.

Fig. 1b zeigt ein Schema für das Reaktionsprinzip einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens. Nach Umsetzung einer Probelösung mit 3 Rezeptoren  $R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$ , von denen  $R_1$  das mit dem zu bestimmenden allergenspezifischen Antikörper spezifische Allergen ist,  $R_2$  ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE bzw. IgG gerichteten Antikörper und einer Markierung und  $R_3$  ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE bzw. IgG gerichteten Antikörper und Biotin ist, in Gegenwart einer Festphase, an der Biotin gebunden ist, bildet sich der dargestellte Komplex. An das Allergen 1 sind die in der Probelösung enthaltenen, zu bestimmenden allergenspezifischen Antikörper 3 gebunden, an die wiederum Rezeptoren  $R_2$  9 und  $R_3$  5 gebunden sind. Die Immobilisierung erfolgt durch Zugabe von Streptavidin 11, das dann den gebildeten Komplex über die Bindung mit dem in  $R_3$  enthaltenen Biotin und dem an der Festphase gebundenen Biotin fixiert.

Die beiden in den Beispielen erwähnten monoklonalen Antikörper gegen humanes IgE sind bei der European Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, GB hinterlegt unter folgenden Bezeichnungen:

MAK 323 : ECACC 88022505

MAK 748 : ECACC 88022506.

#### Beispiel 1

Es wurden monoklonale Maus-Antikörper gegen humanes Immunglobulin E hergestellt.

Balb/c-Mäuse wurden mit humanem IgE (100 µg in 0,3 ml komplettem Freund'schem Adjuvans) intraperitoneal primär immunisiert. In vier- bis sechswöchigen Abständen wurde die Immunisierung mit je 50 µg IgE in 0,2 ml inkomplettem Freund'schem Adjuvans intraperitoneal und einmal mit 50 µg IgG in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung intravenös verstärkt.

Am Tag vor der Fusion wurden die Balb/c-Mäuse durch cervicale Dislokation getötet. Unter sterilen Bedingungen wurden 4 bis 5 ml PBS in die Bauchhöhle gespritzt und nach einer Minute wieder abgesaugt. Die ausgespülten Zellen wurden in DMEM gewaschen und in DMEM-Vollmedium in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  pro Einzeltüpfel auf 24 Tüpfelkulturplatten verteilt.

Einer immunisierten Maus wurde unter aseptischen Bedingungen die Milz entnommen. Das Milzgewebe wurde zerschnitten und die freigesetzten Zellen in

DMEM (Dulbeccos Minimal Essential Medium) suspendiert (ca.  $5 \times 10^7$  Zellen). Zu der Zellsuspension wurden  $5 \times 10^7$  Zellen der Maus-Myelom-Linie Ag8.653, die unter der Bezeichnung CRL-1580 bei ATCC erhältlich ist, gegeben. Das Zellgemisch wurde durch Zentrifugation sedimentiert und die überstehende Flüssigkeit vollständig abgesaugt. Zu dem Zellsediment wurden 0,8 ml einer 50%igen PEG-Lösung (Polyethylenglykol) bei 37°C zugegeben und eine Minute lang gleichmäßig verteilt und anschließend 5 ml DMEM bei Raumtemperatur zugegeben und 5 Minuten lang gleichmäßig verteilt. Nach Zugabe von weiteren 20 ml DMEM wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, in 96 ml frischem DMEM Vollmedium (DMEM + 15% foetales Kälberserum + Glutamin + Pyruvat) resuspendiert und auf 4 x 24 Tüpfelkulturplatten verteilt, die mit Maus-Bauchhöhlen-Makrophagen vorbeschickt worden waren. Die Kulturen wurden am 2., 3., 5., 7., 10. und 12. Tag mit HAT-DMEM-Vollmedium (DMEM-Vollmedium, das  $4 \times 10^{-7}$  M Aminopterin,  $1 \times 10^{-4}$  M Thymidin und  $3 \times 10^{-5}$  M Hypoxanthin enthält) gefüttert.

Mikrotiterplatten wurden mit Anti-Maus-Ig vom Schaf (10 µg/ml 0,9%ige NaCl-Lösung; 150 µl Antikörperlösung pro Tüpfel) beschichtet und nach einer Stunde bei Raumtemperatur dreimal mit einer Lösung, die 1% RSA und 0,9% NaCl enthielt, gewaschen. Je 100 µl Kulturüberstand wurden in die beschichteten Tüpfel pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Überstände wurden die Tüpfel mit 100 µl einer Lösung, die ein Konjugat aus IgE und Peroxidase enthielt und der 100 µg humanes IgG/ml zugegeben waren, beschickt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl ABTS-Lösung, das als Substrat diente, pipettiert und die Farbentwicklung nach 20minütiger Reaktionszeit photometrisch bestimmt.

Hybridomzellen aus Primärkulturen wurden getrennt in Suspension gebracht (ca.  $1 \times 10^5$ /ml DMEM) und mittels eines Zellsorters auf 4 x 24 Zellkulturplatten, deren Tüpfel mit DMEM-Vollmedium und  $10^3$  pro Tüpfel Maus-Makrophagen vorbeschickt waren, so ausgesät, daß in jeden Tüpfel nur eine Hybridomzelle gelangte. Pro Zellkulturplatte wuchsen 20 bis 60% der Tüpfel-Hybridomklone aus.

Ab dem 14. Tag nach der Fusion war in allen 96 Teilkulturen Hybridomwachstum erkennbar. 12 Teilkulturen, deren Überstände bei der Überprüfung im Anti-IgE-Elisa deutlich positive Reaktionen ergaben, wurden auf ca.  $5 \times 10^6$  Zellen expandiert und über den Cytofluorograph durch Einzelzellablage kloniert. Die Überstände von heranwachsenden Klonen wurden erneut auf ihren Gehalt an Anti-IgE im Elisa geprüft. Ca. 40 Klone mit positiver Reaktion wurden durch Kryopräservierung in flüssigem N<sub>2</sub> gesichert. Die Antikörper von 23 Einzelklonen wurden auf ihre Feinspezifität durch Elisa untersucht. Die Antikörper aller 23 Klone reagierten mit humanem IgE, nicht aber mit menschlichem IgG, IgA, IgM oder IgD und auch nicht mit anderen Bestandteilen im menschlichen Blutplasma.

#### Beispiel 2

Im Serum eines Allergikers wurde die Menge an Antikörpern gegen Katzenepithelien untersucht. Dazu wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

Konjugatpuffer:

0,1 M Tris-HCl, pH 7,6.

0,04 M KCl,  
0,2% RSA (Rinderserumalbumin)  
3,0% Polyethylenglykol (PEG) 40 000  
0,02% Dimethyl-aminoantipyrin,  
0,01% Merthiolat.

Inkubationspuffer:  
0,1 M Tris-HCl, pH 7,6,  
0,04 M KCl,  
0,2% RSA,  
3,0% PEG 40 000,  
0,01% Merthiolat.

Waschlösung:  
0,9% NaCl-Lösung,  
1,6% Zusatz (Proteine, Detergenz).

Es wurde das Serum eines Allergikers RAST-Klasse 3 sowie ein Nichtallergiker-Serum verwendet. Je 500 µl Serum wurden eine Stunde bei Raumtemperatur in Lurantubes, die mit gemäß Beispiel 1 erhaltenem monoklonalem Antikörper gegen IgE (MAK M 323, ECACC 88022505) beschichtet waren, inkubiert. Es wurde dreimal mit Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden 500 µl einer Lösung von Katzenepithelien Nummer 240A/86 (Allergopharm, Ch. 025969) in einer Verdünnung von 1:100 in Inkubationspuffer zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit Waschlösung gewaschen. Es wurden jeweils weitere 500 µl Serum zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal mit Waschlösung gewaschen. Dann wurden 500 µl einer Lösung, die 100 mU/ml eines Konjugats aus dem Fab-Fragment des gemäß Beispiel 1 erhaltenen monoklonalen Antikörpers gegen IgE MAK M 323 und  $\beta$ -Galactosidase (50 U/ml) verdünnt in Konjugatpuffer enthielt, zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Waschlösung gewaschen. Zur Bestimmung der gebundenen Markierung wurden 500 µl Chlorphenolrot-Galactosid 50 mM zugegeben und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Extinktion wurde dann bei 550 nm gegen den Substratleerwert gemessen. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wird der Test mit Serum durchgeführt, wobei jedoch statt mit Allergen mit Inkubationspuffer inkubiert wird.

Für die Inkubation mit Inkubationspuffer wurde eine Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  von 0,276 gemessen. Die Extinktionsdifferenz für die Inkubation mit der Allergenlösung  $\Delta E$  war gleich 0,435. Damit betrug die Differenz zwischen beiden Werten, die der Bindung von allergenspezifischen Antikörpern zuzuschreiben ist, 0,159 E. Bei der Auswertung des Nichtallergikerserums ergab sich kein Anstieg der Extinktion gegenüber der Inkubation mit Inkubationspuffer statt Allergen.

### Beispiel 3

Wie im Beispiel 2 beschrieben, wurde eine Antikörperbestimmung gegen Katzenepithelien durchgeführt, wobei anstelle von MAK M 323 der MAK 7H8 (ECACC 88022506) verwendet wurde.

Dabei wurde für die Inkubation mit Inkubationspuffer  $\Delta E=0,460$ , für die Inkubation mit der Allergenlösung  $\Delta E=0,599$  gemessen. Die Differenz, die der Bindung von allergenspezifischen Antikörpern zuzuschreiben ist betrug  $\Delta E=0,139$ . Bei der Auswertung des Nichtallergikerserums ergab sich wie im Beispiel 2 kein

### Extinktionsanstieg.

### Beispiel 4

Es wurde die Menge an allergenspezifischen Antikörpern in einem Humanserum bestimmt, wobei das Testverfahren einstufig durchgeführt wurde.

Für die Durchführung wurden als Konjugatpuffer und Inkubationspuffer Lösungen verwendet, die dieselbe Zusammensetzung wie im Beispiel 2 hatten. Als Waschlösung wurde eine Lösung, die 0,025% NaCl und 1 mg/l Kupfersulfat enthielt, verwendet. Die Inkubation erfolgte in Tubes, die mit Thermo-RSA und Streptavidin beschichtet waren. Die Beschichtung erfolgte wie in DE 36 40 412 beschrieben. Die Beladekonzentration betrug 10 000 µg/ml.

Je 100 µl Serum (Allergikerserum RAST-Klasse 3; Nichtallergikerserum) wurden mit 150 µl Inkubationspuffer und 250 µl einer Lösung von Katzenepithelien Nr. 240A/86 Allergopharm, Ch. 025969 (Verdünnung 1:100 in Inkubationspuffer) eine Stunde bei Raumtemperatur in Thermo-RSA-Streptavidintubes inkubiert. Eine Lösung eines Konjugates aus dem Fab-Fragment des gemäß Beispiel 1 erhaltenen Antikörpers M323 und aus Peroxidase mit 300 U/ml in Konjugatpuffer wurde mit einer Lösung des gemäß Beispiel 1 erhaltenen Antikörpers M323 in biotinylierter Form mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml in Inkubationspuffer 1:1 gemischt und 500 µl dieser Mischung wurden in die Thermo-RSA-Streptavidintubes pipettiert und 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit Waschlösung gewaschen. Zur Auswertung wurden 1000 µl ABTS-Lösung (1,9 mmol/l) als Substrat zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 405 nm gegen den Substratleerwert gemessen.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde der Test wie oben beschrieben, durchgeführt, wobei jedoch statt Allergen Inkubationspuffer verwendet wurde. Die folgenden Extinktionsdifferenzen wurden erhalten:

Inkubation	Allergiker-serum (mE)	Nichtallergiker-serum (mE)
Puffer	371	321
Allergen	877	316
Differenz	506	5

### Beispiel 5

Es wurde eine Bestimmung allergenspezifischer Antikörper unter Verwendung von Latexpartikeln als fester Phase durchgeführt.

Als Inkubationspuffer wurde eine Lösung, die 0,1 M Tris HCl, pH 7,5; 0,04 M KCl; 3% PEG 6000 und 0,5% Pluronic F 68 enthielt, verwendet.

Zur Beschichtung der als Markierung verwendeten Latexpartikel wurden Antikörper, die gemäß Beispiel 1 erhalten worden waren, in 5 ml 15 mM Imidazolpuffer, pH 7,5, der 20 mM NaCl enthielt, zu 0,5 mg/ml angelöst. Nach Zugabe von 180 µl Latexsuspension wurde 2 Stunden bei 4°C gerührt. Anschließend wurde 40 Minuten zentrifugiert und der Überstand in 50 mM Glycinpuffer + 0,15% Tween 20 resuspendiert. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt, wobei beim zweiten und drit-

ten Waschen kein Tween 20 mehr verwendet wurde. Nach Beendigung des dritten Waschschrittes wurde der Niederschlag in 1,7 ml 200 mM Glycinpuffer aufgenommen. Man erhielt eine Suspension, die 1% Latexpartikel enthielt.

10 µl Allergikerserum RAST-Klasse 3 und 50 µl einer Lösung von Katzenepithelien Nr. 240A/86 Allergopharm Ch. 025969, die 1:10 000 in Inkubationspuffer verdünnt war, wurden direkt in eine Küvette pipettiert und zusammen bei 37°C 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 20 µl der Latexsuspension zugegeben. Nach Zugabe von 920 µl Inkubationspuffer wurde die Extinktion bei 623 nm bei 37°C im Spektralphotometer gemessen. Jede Küvette wurde im Zyklus von einer Minute 15 Minuten lang gemessen.

Zur Bestimmung unspezifischer Agglutinationen wurde der Test, wie oben beschrieben, durchgeführt, wobei statt Serum Inkubationspuffer verwendet wird. Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten:

Zeit (min)	Inkubationspuffer (mE)	Allergen (mE)
2	2032	1514
15	1963	1948
Differenz	-69	+434

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von allergenspezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten nach dem Prinzip des Immunoassays durch Inkubation mit mindestens zwei Rezeptoren  $R_1$  und  $R_2$ , die mit dem zu bestimmenden Antikörper bindefähig sind, wobei  $R_2$  eine Markierung trägt, Trennung der festen von der flüssigen Phase und Messung der Markierung in einer der beiden Phasen, dadurch gekennzeichnet, daß man als  $R_1$  das mit dem zu bestimmenden Antikörper spezifisch bindefähige Allergen und als  $R_2$  ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteten Antikörper und einer Markierung verwendet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die den zu bestimmenden Antikörper enthaltende Probe mit einem weiteren Rezeptor  $R_3$  inkubiert, der die Bindung an die feste Phase vermittelt und ein gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteter Antikörper ist, der in geeigneter Weise derivatisiert ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als  $R_3$  ein gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteter Antikörper, der an eine Festphase gebunden ist, verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als  $R_3$  ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteter Antikörper und einem Partner eines spezifisch bindenden Paares verwendet, wobei die Immobilisierung dann in einem weiteren Inkubationsschritt über den zweiten Partner des spezifisch bindenden Paares erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der für  $R_3$  verwendete Antikörper ein Antikörper ist, dessen Paratop mit solchen Epitopen des Fc-Teils von IgE- bzw. IgG-Antikörpers bindet, daß eine Bindung eines

weiteren Rezeptors  $R_2$  an den Fc-Teil unmöglich gemacht ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß  $R_2$  und  $R_3$  denselben Antikörper enthalten.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man nach Inkubation der Probe mit  $R_3$  vor Inkubation der Probe mit  $R_2$  der Lösung Fc-Fragmente von Anti-IgE- bzw. -IgG-Antikörpern zusetzt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zuerst  $R_3$  mit einem Teil der Probe, anschließend mit  $R_1$  dann mit dem Rest der Probe und mit  $R_2$  inkubiert.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor  $R_2$  als Markierung ein Enzym, eine fluoreszierende, chemilumineszierende oder radioaktive Substanz aufweist.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Markierung für den Rezeptor  $R_2$  partikuläre agglutinierbare Träger verwendet.

11. Reagenz zur Bestimmung von allergenspezifischen Antikörpern in Körperflüssigkeiten nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Rezeptor  $R_1$ , der ein für den zu bestimmenden Antikörper spezifisches Allergen ist und einen Rezeptor  $R_2$ , der ein Konjugat aus einem gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteten Antikörper und einer Markierung ist, enthält.

12. Reagenz nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin einen Rezeptor  $R_3$  enthält, der einen gegen den Fc-Teil von IgE oder IgG gerichteten Antikörper enthält und die Bindung an die feste Phase vermittelt.

Nummer:  
Int. Cl. 4:  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

38 20 556  
G 01 N 33/53  
16. Juni 1988  
21. Dezember 1989

1/1

3820556

16. Aug. 1988

26 \*

FIG. 1a

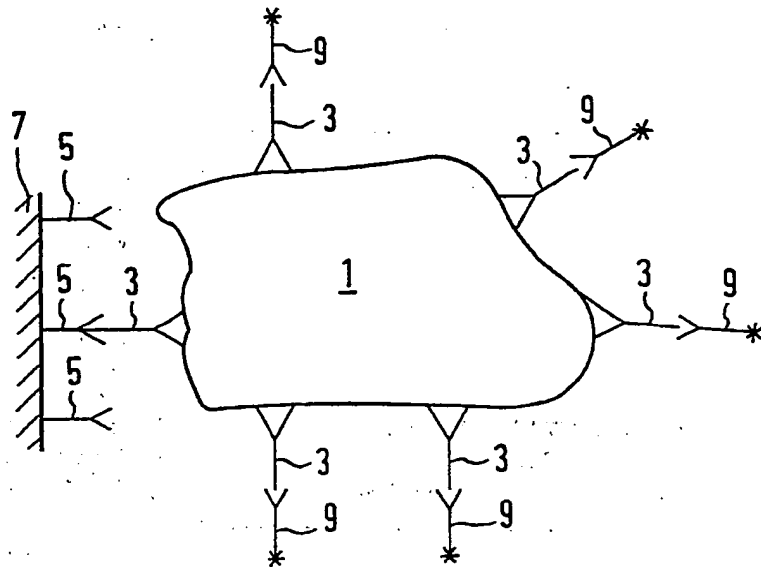


FIG. 1b

